

46-
66-
**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representations of
the original documents submitted by the applicant.**

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

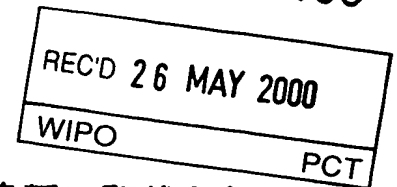
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT/JP 00/02053

30.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



EKV

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 4 月 2 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 0 9 6 8 4 7 号 ✓

出 願 人

Applicant (s):

株式会社片山化学工業研究所

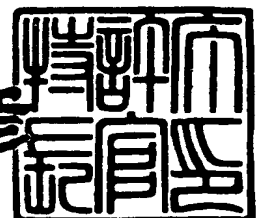
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 5 月 1 2 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 3 2 6 1 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 PKA-8872

【提出日】 平成11年 4月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C08L 89/00
A23C 21/10
A01N 63/00
A01N 59/16

【発明の名称】 銀含有複合蛋白質およびそれを用いた抗菌剤

【請求項の数】 3

【発明者】
【住所又は居所】 大阪市東淀川区東淡路 2 丁目 10 番 15 号 株式会社片山化学工業研究所内

【氏名】 川口 芳広

【特許出願人】
【識別番号】 000154727
【氏名又は名称】 株式会社片山化学工業研究所

【代理人】
【識別番号】 100065248
【弁理士】
【氏名又は名称】 野河 信太郎
【電話番号】 06-6365-0718

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014203
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

特平 1 1 - 0 9 6 8 4 7

【包括委任状番号】 9721628

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 銀含有複合蛋白質およびそれを用いた抗菌剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛋白質中の活性チオール基の含有割合が 0. 1 ～ 2 0 0 μ モル / g である水可溶性の蛋白質と銀塩とを水中で接触させることにより得られる水不溶性の銀含有複合蛋白質。

【請求項 2】 水可溶性の蛋白質が、ホエー蛋白質、卵殻膜蛋白質もしくはホエー蛋白質の加水分解物または水可溶化物である請求項 1 記載の銀含有複合蛋白質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の銀含有複合蛋白質を有効成分として含有する抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は抗菌性を有する新規な銀含有複合蛋白質に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

近年、医療用機械器具、文具類、繊維製品、紙製品、日用雑貨品や浴室製品などにおいて、健康衛生面に配慮して、かびや細菌などの各種微生物が繁殖しないように抗菌処理を施したものが多く用いられている。例えば、病院においては、院内感染を防止する観点から、抗菌性を付与したプラスチック性の文具類や器具などが用いられている。このように人体や食品などに直接接触するものについては、より高い安全性が求められ、抗菌性能の優れた抗菌剤およびその処理方法の開発が望まれている。

【 0 0 0 3 】

このような抗菌剤として、水不溶性の硬蛋白質、例えば卵殻膜、羽毛、羊毛、絹およびこれらから分離したコラーゲン、絹フィブロイン、エラスチンなどに、銀、銅、亜鉛などの抗菌性の金属を吸着させた蛋白質抗菌剤が提案されている（特開平 6 - 6 5 0 1 3 号公報、特開平 8 - 1 8 8 5 1 3 号公報および特開平 8 -

258235号公報参照)。

【0004】

上記の公報に記載された蛋白質抗菌剤は、例えば、卵殻膜粉末と硝酸銀水溶液とを混合・攪拌し、得られた混合溶液中の沈殿を濾取・水洗・脱水および乾燥することにより得ている（例えば、特開平6-65013号公報、[0011]参照）。

【0005】

しかしながら、このようにして得られた蛋白質抗菌剤は、各種製品に十分な抗菌活性を付与することができなかった。その要因としては、蛋白質抗菌剤中の抗菌性の金属の含有率が低いこと、および蛋白質と抗菌性の金属との結合が物理的あるいはイオンの弱い吸着によるもので、水洗などにより抗菌性の金属が蛋白質から容易に遊離することが考えられる。

【0006】

他方、日本薬局方には、銀と蛋白質との化合物としてプロテイン銀が記載されている。銀と蛋白質との化合物は、銀イオンとの結合によって高次の構造変化を起こす水不溶性のペプチドと、分子内にほとんどチオール基を有さないために銀イオンと結合しにくい水可溶性のペプチドとの共役により構成されるペプチド集合体として存在している。

したがって、プロテイン銀を医薬品以外の用途に用いた場合、プロテイン銀が容易に溶出してしまい、抗菌剤としての十分な効果が得られない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、抗菌性の銀が蛋白質から容易に遊離することがなく、しかも銀含有率の高い水不溶性の複合蛋白質を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、特定量の活性チオール基を含有する水可溶性の蛋白質と銀塩とを水中で接触させることにより、効率的に銀を担持した新規な複合蛋白質が得られ、その複合体が、蛋白質分子

上において、銀を効率的に配位するというような極めて高い抗菌活性をもった事実を見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

かくして、本発明によれば、蛋白質中の活性チオール基の含有割合が0.1～200 μ モル/gである水可溶性の蛋白質と銀塩とを水中で接触させることにより得られる水不溶性の銀含有複合蛋白質が提供される。

【0010】

また、本発明によれば、上記の銀含有複合蛋白質を有効成分として含有する抗菌剤が提供される。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明における「活性チオール基」は、重金属化合物の水溶液と容易に反応して金属メルカプチド誘導体を生成するメルカプト基(—SH)を意味する。

本発明において用いられる蛋白質の活性チオール基の含有割合は、蛋白質重量あたり0.1～200 μ モル/g、好ましくは5～100 μ モル/gである。

【0012】

活性チオール基の含有割合が0.1 μ モル/g未満の場合には、活性チオール基に結合する銀が少なく、銀含有率の高い複合蛋白質が得られないので好ましくない。また、活性チオール基の含有割合が200 μ モル/gを超える場合には、活性チオール基への銀の結合が局在化した水不溶性複合体として析出する場合があるので好ましくない。つまり、このような現象は、結果として、銀結合量の低下を引き起こす。

【0013】

活性チオール基の含有割合は、予め定量した蛋白質の水溶液を調製し、DTNB法(エルマン法)によりL-システイン相当量として測定することができる(生物化学実験法10「SH基の定量法」、学会出版センター発行、第86～93頁参照)。

【0014】

本発明における「活性チオール基の含有割合が0.1～200 μ モル/gの水

可溶性の蛋白質」としては、活性チオール基の含有割合が上記の範囲内にある蛋白質であれば特に限定されない。具体的には、ホエー蛋白質、卵殻膜蛋白質もしくはホエー蛋白質の加水分解物または水可溶化物が挙げられ、これらを好適に用いることができる。

また、上記の水可溶性の蛋白質は、元の蛋白質の特性のひとつである乳化性が期待できるので好ましい。

【0015】

「ホエー蛋白質」は、元来シスチンを比較的多量に含有する蛋白質であり、酵素や熱あるいは他の生理的要因などによって変動するが、活性チオール基を多く形成する。

このホエー蛋白質は、 α -ラクトアルブミンや β -ラクトグロブリンなどの水可溶性蛋白質を含み、チーズ製造時に副生する乳清（ホエー）中に多く存在し、工業的に大量入手が可能である。

【0016】

市販のホエー蛋白質としては、例えば、太陽化学株式会社製のサンラクトN-5（商品名）があり、この場合、活性チオール基の含有割合は、 $50\mu\text{mol/g}$ 程度である。

【0017】

ホエーは、ホエー蛋白質以外に、還元糖である乳糖および無機質などを含む。特に乳糖は、蛋白質と銀との結合を阻害する恐れがあるので、銀と接触させる前に予め除去しておくのが好ましい。

例えば、ホエーまたは乳糖が残存して含有するホエー蛋白質を用いる場合には、それらを脱イオン水に溶解し、この溶液を脱イオン水に対して透析することにより、乳糖を除去することができる。

【0018】

分子内にシスチンを多く含有する蛋白質としては、毛髪、羊毛および羽毛などの硬蛋白質ケラチンも挙げられる。しかしながら、毛髪や羽毛などは、本発明のような工業用材料として用いるには、取り扱いが困難である。また、羊毛はシスチン含量が多いけれども、本発明に用いるにはコストの面で不利である。

【0019】

羊毛のシスチン含量に匹敵する材料としては卵殻膜蛋白質があり、この加水分解物または水可溶化物は本発明の蛋白質として好適に用いられる。

「卵殻膜蛋白質」は、鳥類の卵の卵殻の内側の膜を構成する水不溶性の蛋白質であり、本発明に用いられるものとしては、工業用材料としての入手し易さの点から、食品工業などにおいて大量に消費されている鶏卵やウズラの卵などを原材料とするのが好ましい。

【0020】

水不溶性の卵殻膜蛋白質をアルカリ分解、酵素分解または還元剤処理などに付すことにより、特定量の活性チオール基を含有する水可溶性の加水分解物や水可溶化物を得ることができる。つまり、卵殻膜蛋白質中のジスルフィド結合を開裂して、活性チオール基とする処理条件を選択することにより、蛋白質中の活性チオール基の含有割合を調整することができる。

【0021】

以下に、卵からの卵殻膜の回収ならびに卵殻膜の加水分解処理および水可溶化処理について具体的に説明する。

(卵殻膜の分離)

卵は、外側から卵殻、卵殻膜、卵白、卵黄の順に構成され、最外層の卵殻と卵殻膜とが密着している。卵殻膜を回収するには、まず卵殻および卵殻膜と、卵白および卵黄とを通常、割卵により分離する。次いで、卵殻膜を、例えばピンセットを用いて卵殻から剥離する。

【0022】

工業的に卵殻膜を大量に回収するには、密着した卵殻と卵殻膜とを、酸（例えば、濃度10%程度の塩酸）で処理し、卵殻の主成分である炭酸カルシウムを溶解し、これを濾過して分離する。

酸処理を効率的に行うためには、密着した卵殻と卵殻膜とを予め機械的に粉碎しておくのが好ましい。さらに、この粉碎品を分級し、比重差によって分別して酸処理するのがより好ましい（特開平3-45264号公報参照）。

この公報に記載の方法で分離・回収された卵殻膜は、例えば、卵殻膜をアミノ

酸やジペプチドあるいはトリペプチドにまで分解した「卵醬」という調味料、および水可溶化蛋白質として表皮細胞や繊維芽細胞を活性化させる化粧品の成分などに応用されている。

【0023】

次いで、上記の方法により得られた卵殻膜を前記のようにアルカリ分解、酵素分解または還元剤処理などに付して、所望割合の活性チオール基を含有する水可溶性の加水分解物または水可溶化物を得る。これらの処理のうちでも、アルカリ分解が工業的に好ましい。

【0024】

(アルカリ分解)

卵殻膜を、濃度1～30%程度のアルカリ金属水酸化物（例えば、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム）の水性溶液（例えば、水またはエタノール濃度40%の水性溶液）中で処理する。アルカリ金属水酸化物の濃度は、卵殻膜の量および処理温度などの条件によって適宜選択すればよい。例えば、卵殻膜の量が50g程度の場合、1規定に調製したアルカリ金属水酸化物の水性溶液1000mlで処理される。

【0025】

アルカリ金属水酸化物の水性溶液を加えた卵殻膜を混合・攪拌することにより、アルカリ分解を促進する。処理温度は40～80℃程度、処理時間は3～24時間程度で充分である。

処理した水性溶液を濾過し、得られた濾液を脱イオン水に対して透析するなどして、卵殻膜蛋白質の加水分解物を得る。

【0026】

(酵素分解)

卵殻膜を蛋白質分解酵素で処理することにより加水分解物を得られる。

蛋白質分解酵素としては、パパインおよびブロメラインなどの植物起源の蛋白質分解酵素やパンクレアチン、レンニン、トリプシン、キモトリプシンおよびペプシンなどの動物起源の蛋白質分解酵素が挙げられる。

【0027】

この処理は卵殻膜を水に分散させた液で行い、処理時の温度やpHは、用いる酵素の最適温度およびpHに従えばよく、特に限定されない。例えば、パンクレアチンを用いる場合には、温度35～50℃、pH6～8程度が適当である。

処理した溶液を濾過し、得られた濾液を脱イオン水に対して透析するなどして、卵殻膜蛋白質の加水分解物を得る。

【0028】

(還元剤処理)

卵殻膜を還元剤で処理しても、水可溶化物が得られる。この方法では、卵殻膜中のジスルフィド結合を硫化ナトリウム、チオグリコール酸およびβ-チオプロピオン酸またはそのアルカリ塩、あるいは2-メルカプトエタノールなどの還元剤により還元する。還元剤の量は、その種類にもよるが、例えば、β-チオプロピオン酸を用いる場合には、卵殻膜100gに対して、5Nに調製したβ-チオプロピオン酸水溶液2000ml程度である。

【0029】

この処理は卵殻膜を水に分散させた液で行い、例えば、還元剤としてβ-チオプロピオン酸を用いる場合には、温度60～80℃、処理時間5時間程度が適当である。

処理した溶液を濾過し、得られた濾液を脱イオン水に対して透析するなどして、卵殻膜蛋白質の水可溶化物を得る。

【0030】

また、前記のホエー蛋白質は、水可溶性の蛋白質としてそのまま用いることもできるが、上記のアルカリ分解、酵素分解または還元剤処理などに付して得られる加水分解物または水可溶化物として用いることもできる。

【0031】

本発明の「水不溶性の銀含有複合蛋白質」は、活性チオール基の含有割合が0.1～200μmol/gの水可溶性の蛋白質と銀塩とを水中で接触させることにより得ることができる。

【0032】

銀塩としては、水中で銀イオンを解離し、蛋白質と銀との結合を阻害しないも

のであれば特に限定されない。具体的には、硝酸銀、亜硝酸銀、硫酸銀、過塩素酸銀、酸化銀および塩化銀などの無機酸塩、酢酸銀、乳酸銀および蔞酸銀などの有機酸塩、ジアミン銀硝酸塩およびジアミン銀硫酸塩などの錯塩などが挙げられ、中でも無機酸塩が好ましく、硝酸銀および酢酸銀が水に対する溶解性の点で特に好ましい。

【 0 0 3 3 】

蛋白質と銀塩とを水中で接触させる方法としては、混合・攪拌および振盪などの公知の方法を用いることができる。中でも、混合・攪拌が工業的に好ましい。

攪拌を用いた具体的な方法としては、

①蛋白質と銀塩とを水中で一度に混合して攪拌する方法、

②水中で蛋白質を攪拌しつつ、この中に水に溶解した銀塩を徐々に加えて、水中の銀イオン濃度を徐々に上げる方法、および

③水中で蛋白質を攪拌しつつ、この中に細かく粉碎した銀塩を徐々に加えて溶解させ、水中の銀イオン濃度を徐々に上げる方法

などが挙げられる。中でも②の方法は、銀含有複合蛋白質が再現性よく、高回収率で得られるので特に好ましい。

【 0 0 3 4 】

蛋白質と銀塩の割合は、接触させる条件にもよるが、通常、蛋白質 1 g に対して、銀塩 0. 2 ～ 3 g 程度が好ましい。より具体的には、濃度 1 ～ 2 0 m g / m l の蛋白質水溶液 1 0 0 0 m l に対して、濃度 5 ～ 2 5 0 m M 程度の銀塩水溶液 1 0 0 0 m l 程度用いるのが好ましい。ただし、銀含有率の高い複合蛋白質が効率よく得られるのであれば、蛋白質水溶液と銀塩水溶液の液量比は特に限定されない。

【 0 0 3 5 】

また、蛋白質と銀塩とを接触させる際の条件は、蛋白質と銀塩とが均一に混合され、銀含有率の高い複合蛋白質が効率よく得られる条件であればよい。例えば、攪拌による接触の場合には、温度は 0 ～ 7 0 ℃ 程度、処理時間は 2 4 時間以内が適当である。

【 0 0 3 6 】

処理した混合溶液を濾過し、濾取した残渣を脱イオン水およびエタノールなどで洗浄し、乾燥して銀含有複合蛋白質を得る。

得られた複合蛋白質中の銀含有率は、例えば、3%硝酸を用いた溶出銀の定量により求めることができる。

【0037】

【実施例】

この発明を調製例および試験例により以下に説明するが、これらの調製例および試験例によりこの発明が限定されるものではない。

【0038】

調製例1〔アルカリ分解による卵殻膜蛋白質の加水分解物の調製〕

容量500mlの丸底フラスコに含水重量74.36g（乾燥重量10.81g）の卵殻膜、2N-NaOH130mlおよびエタノール86mlを入れて、70℃で64時間、攪拌した。次いで、混合溶液を濾過し、得られた濾液を脱イオン水に対して透析し、卵殻膜蛋白質の加水分解物の水溶液（以下、「可溶化蛋白質A」と称す）188mlを得た。

【0039】

可溶化蛋白質A中の蛋白質濃度をLowry法により測定し、前述の「SH基の定量法」に基づいて、蛋白質濃度から可溶化蛋白質A中の活性チオール基の含有割合を算出した。

得られた結果を以下に示す。また、参考値として、ピウレット法により測定した蛋白質濃度および吸光度（280nm）を併記する。ただし、括弧内の数値は全量換算値（吸光度については、トータルアブソーバンス）を示す。

【0040】

液量	188ml
活性チオール基の含有割合	0.017ミリモル/1（3.2μモル）
蛋白質濃度 Lowry法	3.4mg/ml（639.2mg）
ピウレット法	3.8mg/ml（714.4mg）
吸光度	6.2（1165.6）

【0041】

調製例2〔アルカリ分解による卵殻膜蛋白質の加水分解物の調製〕

容量500mlの丸底フラスコに含水重量79g（乾燥重量11.46g）の卵殻膜、2N-NaOH137mlおよびエタノール92mlを入れて、70℃で96時間、攪拌した。次いで、混合溶液を濾過し、得られた濾液を脱イオン水に対して透析し、卵殻膜蛋白質の加水分解物の水溶液（以下、「可溶化蛋白質B」と称す）640mlを得た。

【0042】

調製例1と同様にして、可溶化蛋白質B中の蛋白質濃度を測定し、その濃度から活性チオール基の含有割合を算出した。得られた結果を以下に示す。

【0043】

液量	640ml
活性チオール基の含有割合	0.055ミリモル/1（35.2μモル）
蛋白濃度 Lowry法	8.0mg/ml（5120mg）
ビウレット法	7.2mg/ml（4608mg）
吸光度	15.99（10231）

【0044】

調製例3〔可溶化蛋白質Aを用いた銀含有複合蛋白質の調製〕

容量100mlのビーカーに、調製例1で得られた可溶化蛋白質A20mlを入れ、攪拌しながら10mMの硝酸銀水溶液20mlを約20分かけて滴下し、滴下後、この混合溶液を1時間、攪拌した。得られた混合溶液を一晩、静置し、濾過した。

濾別した残渣を脱イオン水20mlで2回洗浄し、続いて少量のエタノールで洗浄し、これを乾燥して銀含有複合蛋白質①59.2mgを得た。

【0045】

銀含有複合蛋白質①中の銀含有率を、3%硝酸を用いた溶出銀の定量により求めたところ、4.75重量%であった。

また、濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀含有複合蛋白質①中の銀含有率を求めたところ、8.8重量%であった。このことから銀含有複合蛋白質①は、従来の蛋白質抗菌剤と比較して、濾別後の洗浄によって銀が

ほとんど遊離しなかったことがわかる（比較調整例 1、2 参照）。

【0046】

調製例 4〔可溶化蛋白質 B を用いた銀含有複合蛋白質の調製〕

可溶化蛋白質 A に代えて、調製例 2 で得られた可溶化蛋白質 B を用いること以外は調製例 3 と同様にして、銀含有複合蛋白質② 118.5 mg を得た。

銀含有複合蛋白質②中の銀含有率は、7.0 重量%であった。

また、濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀含有複合蛋白質②中の銀含有率を求めたところ、10.8 重量%であった。このことから調製例 3 と同様に、銀含有複合蛋白質②は、濾別後の洗浄によって銀がほとんど遊離しなかったことがわかる。

【0047】

調製例 5〔ホエー蛋白質を用いた銀含有複合蛋白質の調製〕

容量 300 ml のビーカー中で、ホエー蛋白質（太陽化学株式会社製、商品名：サンラクト N-5、蛋白質含有率 72%、活性チオール基の含有割合 47 μ モル/g）2 g を脱イオン水 200 ml に溶解した。この混合溶液に 50 mM の硝酸銀水溶液 200 ml を添加し、1 時間、攪拌した。得られた混合溶液を一晩静置し、濾過した（濾紙 No. 2 を使用）。

濾別した残渣を脱イオン水 100 ml で 2 回洗浄し、これを乾燥して銀含有複合蛋白質③ 1646 mg を得た（用いた蛋白質に対する回収率 115%）。

【0048】

銀含有複合蛋白質③中の銀含有率を、3%硝酸を用いた溶出銀の定量により求めたところ、4.25 重量%であった。

また、濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀含有複合蛋白質③中の銀含有率を求めたところ、4.86 重量%であった。このことから調製例 3 と同様に、銀含有複合蛋白質③は、濾別後の洗浄によって銀がほとんど遊離しなかったことがわかる。

【0049】

調製例 6〔ホエー蛋白質を用いた銀含有複合蛋白質の調製〕

容量 300 ml のビーカー中で、ホエー蛋白質（太陽化学株式会社製、商品名

: サンラクトN-5、蛋白質含有率72%、活性チオール基の含有割合47 μ モル/g) 2gを脱イオン水180mlに溶解した。次いで、この混合溶液を脱イオン水に対して透析し、乳糖を除去した。

回収した透析内液20mlに10mMの硝酸銀水溶液20mlを添加し、1時間、攪拌した。得られた混合溶液を一晩静置し、濾過した(濾紙No. 2を使用)。

濾別した残渣を脱イオン水50mlで2回洗浄し、これを乾燥して銀含有複合蛋白質④154.8mgを得た。

【0050】

銀含有複合蛋白質④中の銀含有率を、3%硝酸を用いた溶出銀の定量により求めたところ、7.80重量%であった。

【0051】

比較調製例1〔卵殻膜機械粉碎品を用いた銀含有複合蛋白質の調製〕

容量50mlのビーカー中で、卵殻膜機械粉碎品①(太陽化学社製、商品名: サンカクマクP、活性チオール基の含有割合は測定不可)2gに0.2%硝酸銀水溶液10mlを加えて懸濁した。この懸濁液を室温で10分間攪拌し、濾過した(濾紙No. 2を使用)。

濾別した残渣を脱イオン水50mlで3回洗浄し、これを乾燥して銀吸着卵殻膜粉末①1904mgを得た。

【0052】

銀吸着卵殻膜粉末①中の銀含有率を、3%硝酸を用いた溶出銀の定量により求めたところ、0.059重量%であった。

また、濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀吸着卵殻膜粉末①中の銀含有率を求めたところ、0.68重量%であった。このことから銀吸着卵殻膜粉末①は、濾別後の洗浄によって銀が遊離したことがわかる。

【0053】

比較調製例2〔卵殻膜機械粉碎品を用いた銀含有複合蛋白質の調製〕

卵殻膜機械粉碎品に代えて、石臼式磨砕および気流式粉碎・分級により得られた卵殻膜機械粉碎品②を用いること以外は比較調製例1と同様にして、銀吸着卵

殻膜粉末② 1928 mg (活性チオール基の含有割合は測定不可) を得た。

銀吸着卵殻膜粉末②中の銀含有率は、0.026量%であった。

また、濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀吸着卵殻膜粉末②中の銀含有率を求めたところ、0.67重量%であった。このことから銀吸着卵殻膜粉末②は、濾別後の洗浄によって銀が遊離したことがわかる。

【0054】

試験例 1 [銀含有複合蛋白質の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力試験]

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質②および調製例 5 で得られた銀含有複合蛋白質③の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力試験を次の条件で行った。

【0055】

測定方法 銀等無機抗菌剤の抗菌評価試験法II

(1995年度版、銀等無機抗菌剤研究会編)

最小殺菌濃度 (MBC) の測定に準拠

供試菌 *Staphylococcus aureus* IF0 12732

使用培地 SCD培地

SCD寒天培地

銀含有複合蛋白質②および銀含有複合蛋白質③の黄色ブドウ球菌に対する最小殺菌濃度 (MBC値) は、それぞれ 3.13 ppm未満および 6.25 ppmであった。

【0056】

試験例 2 [銀含有複合蛋白質の大腸菌に対する抗菌力試験]

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質②および調製例 5 で得られた銀含有複合蛋白質③の大腸菌に対する抗菌力試験を次の条件で行った。

【0057】

測定方法 銀等無機抗菌剤の抗菌評価試験法II

(1995年度版、銀等無機抗菌剤研究会編)

最小殺菌濃度 (MBC) の測定に準拠

供試菌 *Escherichia coli* IF0 3972

使用培地 普通ブイヨン培地 (NB培地)

普通ブイヨン寒天培地 (NA培地)

銀含有複合蛋白質②および銀含有複合蛋白質③の大腸菌に対する最小殺菌濃度 (MBC値) は、それぞれ 1.57 ppm未満および 6.25 ppmであった。

【0058】

試験例 3 [銀含有複合蛋白質の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力試験]

比較調製例 1 で原料として用いた卵殻膜機械粉碎品①および該比較調製例で得られた銀吸着卵殻膜粉末①、ならびに比較調製例 2 で原料として用いた卵殻膜機械粉碎品②および該比較調製例で得られた銀吸着卵殻膜粉末②の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力試験を次の条件で行った。

【0059】

測定方法 銀等無機抗菌剤の抗菌評価試験法II
(1995年度版、銀等無機抗菌剤研究会編)
最小殺菌濃度 (MBC) の測定に準拠

供試菌 Staphylococcus aureus IF0 12732

使用培地 SCD培地
SCD寒天培地

【0060】

抗菌力試験は、各薬剤の添加濃度を 1.56~400 ppmの範囲で変化させて行ったが、卵殻膜機械粉碎品①、銀吸着卵殻膜粉末①、卵殻膜機械粉碎品②および銀吸着卵殻膜粉末②のいずれにおいてもブドウ球菌に対する抗菌力は認められなかった。

【0061】

調製例 7 [銀含有複合蛋白質形成に及ぼす硝酸銀濃度の影響]

硝酸銀水溶液の濃度を 0.1 mM、0.5 mM、2 mM、5 mM、10 mMおよび 50 mMと変化させること以外は調製例 3 と同様にして、銀含有複合蛋白質を得た。

銀含有複合蛋白質を濾別した濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀含有複合蛋白質中の銀含有率を求めた。

また、可溶化蛋白質 A (Lowry法による蛋白質濃度 3.4 mg/ml、2

0 ml) の蛋白質量 68 mg と銀含有複合蛋白質の収量から回収率を求めた。
得られた結果を図 1 に示す。

【0062】

調製例 8 [銀含有複合蛋白質形成に及ぼす硝酸銀濃度の影響]

硝酸銀水溶液の濃度を 0.1 mM、0.5 mM、2 mM、5 mM、10 mM および 50 mM と変化させること以外は調製例 4 と同様にして、銀含有複合蛋白質を得た。

銀含有複合蛋白質を濾別した濾液中の銀イオン濃度を定量し、この数値から逆算して、銀含有複合蛋白質中の銀含有率を求めた。

また、可溶化蛋白質 B (Lowry 法による蛋白質濃度 8.0 mg/ml、20 ml) の蛋白質量 160 mg と銀含有複合蛋白質の収量から回収率を求めた。
得られた結果を図 2 に示す。

【0063】

図 1 および図 2 から、銀含有率の高い銀含有複合蛋白質が高回収率で得られることがわかる。

【0064】

試験例 4 [銀含有複合蛋白質と公知の銀含有抗菌剤との抗菌力の比較試験]

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質② (銀含有率 7.0 重量%) および公知の銀含有抗菌剤の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力の比較試験を、試験例 1 と同様の条件で行った。

公知の銀含有抗菌剤としては次のものを用い、参考のため硝酸銀についても同様に試験した。

Zeomic (商品名、株式会社シナネンゼオミック製、

銀含有率約 2.5 重量%)

Novaron (商品名、東亜合成株式会社製)

得られた結果を表 1 に示す。なお、表中の数値は生菌数を示す。

【0065】

【表 1】

薬剤添加濃度(ppm)	銀含有複合蛋白質②	Zeomic	Novaron	硝酸銀中Ag添加濃度(ppm)	硝酸銀
無添加	2.65×10^6 3.76×10^6	左同	左同	左同	左同
1600	0	0	∞	6.25	0
800	0	0	∞	3.13	0
400	0	0	∞	1.56	0
200	0	3	∞	0.78	1
100	0	1	∞	0.39	∞
50	0	5	∞	0.2	∞
25	0	16	∞	0.1	∞
12.5	0	∞	∞	0.05	∞
6.25	0	∞	∞	0.025	∞
3.13	0	∞	∞	0.013	∞

【0066】

試験例 5〔銀含有複合蛋白質と公知の銀含有抗菌剤との抗菌力の比較試験〕

調製例 5 で得られた銀含有複合蛋白質③（銀含有率 4.25 重量%）および公知の銀含有抗菌剤の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力の比較試験を、試験例 1 と同様の条件で行った。

公知の銀含有抗菌剤としては、前述の Zeomic および Novaron を用い、参考のため硝酸銀についても同様に試験した。

得られた結果を表 2 に示す。なお、表中の数値は生菌数を示す。

【0067】

【表 2】

薬剤添加濃度 (ppm)	銀含有複合 蛋白質③	Zeomic	Novaron	硝酸銀中Ag添 加濃度(ppm)	硝酸銀
無添加	2.65×10^5 3.76×10^5	左同	左同	左同	左同
1800	0	0	∞	6.25	0
800	0	0	∞	3.13	0
400	0	0	∞	1.56	0
200	0	3	∞	0.78	1
100	0	1	∞	0.39	∞
50	0	5	∞	0.2	∞
25	0	16	∞	0.1	∞
12.5	1	∞	∞	0.05	∞
6.25	20	∞	∞	0.025	∞
3.13	∞	∞	∞	0.013	∞

【0068】

試験例 6〔銀含有複合蛋白質と公知の銀含有抗菌剤との抗菌力の比較試験〕

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質②（銀含有率 7.0 重量%）、調製例 5 で得られた銀含有複合蛋白質③（銀含有率 4.25 重量%）および公知の銀含有抗菌剤の大腸菌に対する抗菌力の比較試験を、試験例 2 と同様の条件で行った。

公知の銀含有抗菌剤として、前述の Zeomic および Novaron を用い、参考のため硝酸銀についても同様に試験した。

得られた結果を表 3 に示す。なお、表中の数値は生菌数を示す。

【0069】

【表 3】

薬剤添加濃度 (ppm)	銀含有複合 蛋白質②	銀含有複合 蛋白質③	Zeomic	Novaron	硝酸銀中Ag添 加濃度(ppm)	硝酸銀
無添加	1.72×10^7 1.70×10^7	左同	左同	左同	左同	左同
400.00	0	0	0	0	6.25	0
200.00	0	0	0	0	3.13	0
100.00	0	0	0	0	1.56	0
50.00	0	0	0	0	0.78	0
25.00	0	0	0	13	0.39	0
12.50	0	0	0	16	0.2	0
6.25	0	0	0	∞	0.1	∞
3.13	0	51	44	∞	0.05	∞
1.57	2	203	∞	∞		

【0070】

試験例 7 【銀含有複合蛋白質と公知の銀含有抗菌剤との抗菌力の比較試験】

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質②（銀含有率 7.0 重量%）および公知の銀含有抗菌剤の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力の比較試験を、試験例 1 と同様の条件で行った。

公知の銀含有抗菌剤としては次のものを用い、参考のため硝酸銀についても同様に試験した。

バイカム AK-L S（大塚化学製、銀含有率 15 重量%）

得られた結果を表 4 に示す。なお、表中の数値は生菌数を示す。

【0071】

【表 4】

薬剤添加濃度 (ppm)	銀含有複合 蛋白質②	バイカムAK-LS (大塚化学)	硝酸銀中Ag添 加濃度(ppm)	硝酸銀
無添加	3.50×10^6	左同	左同	左同
100	0	118	6.25	0
50	0	30	3.13	1
25	0	285	1.56	1
12.5	0	275	0.78	1
6.25	0	∞	0.39	133
3.13	4	∞	0.20	∞
1.56	14695	∞	0.10	∞
0.78	∞	∞	0.05	∞
0.36	∞	∞	—	—

(試験菌) *Staphylococcus aureus*

(抗菌剤試料の銀含有率) ESM-Ag : 7%, バイカムAK-LS : 15%

(判定) コロニー数5個以上を生育認めずとする。

【0072】

試験例 8 [銀含有複合蛋白質と局方プロテイン銀との抗菌力の比較試験]

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質② (銀含有率 7.0 重量%) および局方プロテイン銀の黄色ブドウ球菌に対する抗菌力の比較試験を、試験例 1 と同様の条件で行った。

【0073】

測定方法 銀等無機抗菌剤の抗菌評価試験法II

(1995年度版、銀等無機抗菌剤研究会編)

最小殺菌濃度 (MBC) の測定に準拠

供試菌 *Staphylococcus aureus* IF0 12732

使用培地 SCD培地

【0074】

局方プロテイン銀としては次のものを用い、参考のため硝酸銀についても同様

に試験した。

局方プロテイン銀（丸石製薬製、銀含有率 8 重量％）

得られた結果を表 5 に示す。なお、表中の数値は生菌数を示す。

【 0 0 7 5 】

【表 5】

薬剤添加濃度 (ppm)	銀含有複合 蛋白質②	局方プロテイン銀 (丸石製薬)	硝酸銀中Ag添加 濃度(ppm)	硝酸銀
無添加	3.50×10^6	左同	左同	左同
100	0	0	6.25	0
50	0	0	3.13	1
25	0	0	1.56	1
12.5	0	0	0.78	1
6.25	0	128	0.39	133
3.13	4	170	0.20	∞
1.56	14695	∞	0.10	∞
0.78	∞	∞	0.05	∞
0.36	∞	∞	—	—

(試験菌) *Staphylococcus aureus*

(抗菌剤試料の銀含有率) ESM-Ag : 7%、丸石プロテイン銀 : 8%

(判 定) コロニー数 5 個以下を生育認めずとする。

【 0 0 7 6 】

表 1 ～ 4 の結果から、本願発明の銀含有複合蛋白質の抗菌活性が、公知の無機系銀含有抗菌剤よりも優れていることがわかる。特に表 4 に示す試験例 7 で用いた公知の銀含有抗菌剤のバイカム AK-L S は、銀含有率が 1 5 重量％であるにも拘らず、抗菌活性が劣っている。これは、抗菌活性を発揮するにおいて、適当量の銀イオンの徐放性がないためと考えられる。表 5 の結果から明らかなように、本願発明の銀含有複合蛋白質の抗菌活性が局方プロテインよりも優れていることがわかる。

【 0 0 7 7 】

試験例 9 [銀含有複合蛋白質と公知の銀含有抗菌剤とのかび抵抗性の比較試験]

調製例 4 で得られた銀含有複合蛋白質②、調製例 5 で得られた銀含有複合蛋白質③および公知の銀含有抗菌剤 [Zeomic (商品名、株式会社シナネンゼオミック製)] のかび抵抗性の比較試験を次の条件で行った。

【0078】

測定方法 JIS 2911-1981 かび抵抗性試験方法に準拠

特に、下記の項目を参照

3. 試験の準備 3. 5 孢子懸濁液

4. 試験の通則 4. 3. 2 試験結果の表示

表 1 「試験結果の表示方法」

6. 繊維製品の試験 6. 2. 2 湿式法

【0079】

- かび
- 第 1 群 アスペルギルス ニゲル (FERM S-1)
 - 第 2 群 ペニシリウム シトリナム (FERM S-5)
 - 第 3 群 リゾープス ストロニフェル (FERM S-7)
 - 第 4 群 クラドスポリウム クラドスポリオイデス (FERM S-8)
 - 第 5 群 ケトミウス グロボスム (FERM S-11)

【0080】

被塗工紙としては市販のコピー用紙を使用した。塗工は、ペーカー式アプリケーションター (安田精機製作所製) を用い、膜厚 1~10mil の条件で行った。各塗工薬剤は以下のような濃度のものを調製した。塗工後、60℃で1時間、送風乾燥することにより、目的の塗工重量を有する試料片 (5×5cm) を作成した。

銀含有複合蛋白質②の塗工薬剤は、銀含有複合蛋白質②の 256mg と 1280mg をそれぞれ脱イオン水 20ml に分散して調製した。この塗工薬剤を用いて、 $1\text{g}/\text{m}^2$ 、 $2\text{g}/\text{m}^2$ および $5\text{g}/\text{m}^2$ の塗工試料片を作成した。

【0081】

銀含有複合蛋白質③の塗工薬剤は、銀含有複合蛋白質③ 256mg を脱イオン

水 20 ml に分散して調製した。この塗工薬剤を用いて、 1 g/m^2 、 2 g/m^2 および 4 g/m^2 の塗工試料片を作成した。

Zeomic を脱イオン水に分散して 1% および 10% の塗工薬剤を調製した。この塗工薬剤を用いて、 1 g/m^2 、 2 g/m^2 および 10 g/m^2 の塗工試料片を作成した。

抗菌剤の塗工量（両面塗工）を変化させた塗工試料片のかびの培養状態を観察した。なお、各試験毎に未塗工のものを同様に試験してブランクとした。

【0082】

得られた結果を図 3～5 に示す。図中の [] 内の数値は、上記の JIS 2911-1981 の「試験結果の表示方法」に基づいて評価した結果である。

図 3 (a)、(b) および (c) は、それぞれ銀含有複合蛋白質②の塗工量を 1 g/m^2 、 2 g/m^2 および 5 g/m^2 に変化させたときのかびの培養状態である。

図 4 (a)、(b) および (c) は、それぞれ銀含有複合蛋白質③の塗工量を 1 g/m^2 、 2 g/m^2 および 4 g/m^2 に変化させたときのかびの培養状態である。

図 5 (a)、(b) および (c) は、それぞれ Zeomic の塗工量を 1 g/m^2 、 2 g/m^2 および 10 g/m^2 に変化させたときのかびの培養状態である。

【0083】

【発明の効果】

本発明の水不溶性の銀含有複合蛋白質は、蛋白質中の活性チオール基の含有割合が 0.1～200 $\mu\text{mol/g}$ である水可溶性の蛋白質と銀塩とを水中で接触させることにより得られる。

【0084】

本発明の銀含有複合蛋白質は、食品や化粧品分野などにおいて使用されている蛋白質を原料とするものであり、極めて安全性が高い。また、抗菌性の銀が蛋白質から容易に遊離することがなく、銀含有率が高い水準で維持される。

したがって、本発明の銀含有複合蛋白質は、抗菌剤として各種分野での応用が

期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の銀含有複合蛋白質の形成における、硝酸銀水溶液濃度と得られた銀含有複合蛋白質中の回収率およびその銀含有率の関係を示す図である（調製例 7）

。

【図 2】

本発明の銀含有複合蛋白質の形成における、硝酸銀水溶液濃度と得られた銀含有複合蛋白質中の回収率およびその銀含有率の関係を示す図である（調製例 8）

。

【図 3】

本発明の銀含有複合蛋白質②のかび抵抗性試験の結果を示す図である（試験例 9）。

【図 4】

本発明の銀含有複合蛋白質③のかび抵抗性試験の結果を示す図である（試験例 9）。

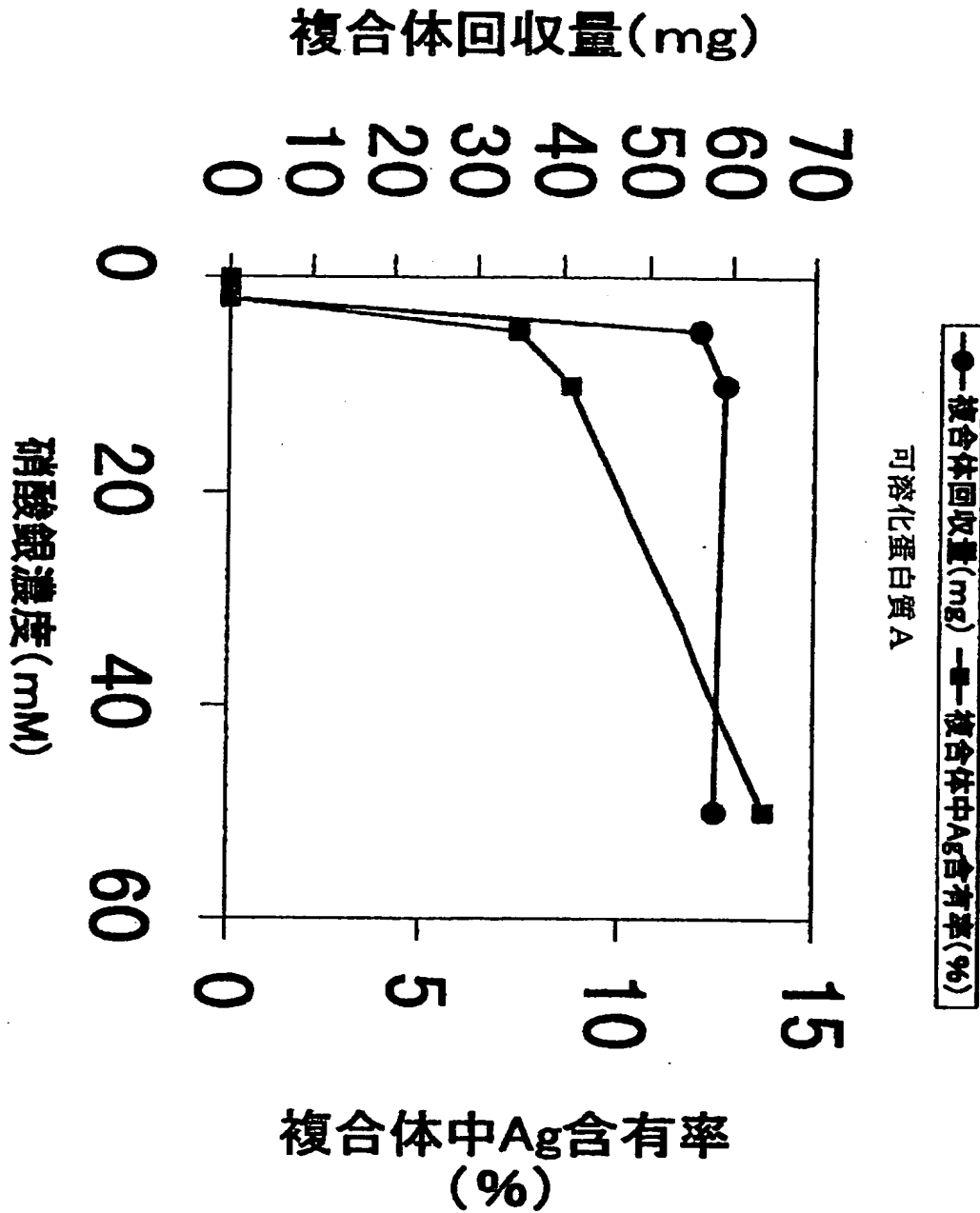
【図 5】

公知の銀含有抗菌剤（Zeomic）のかび抵抗性試験の結果を示す図である（試験例 9）。

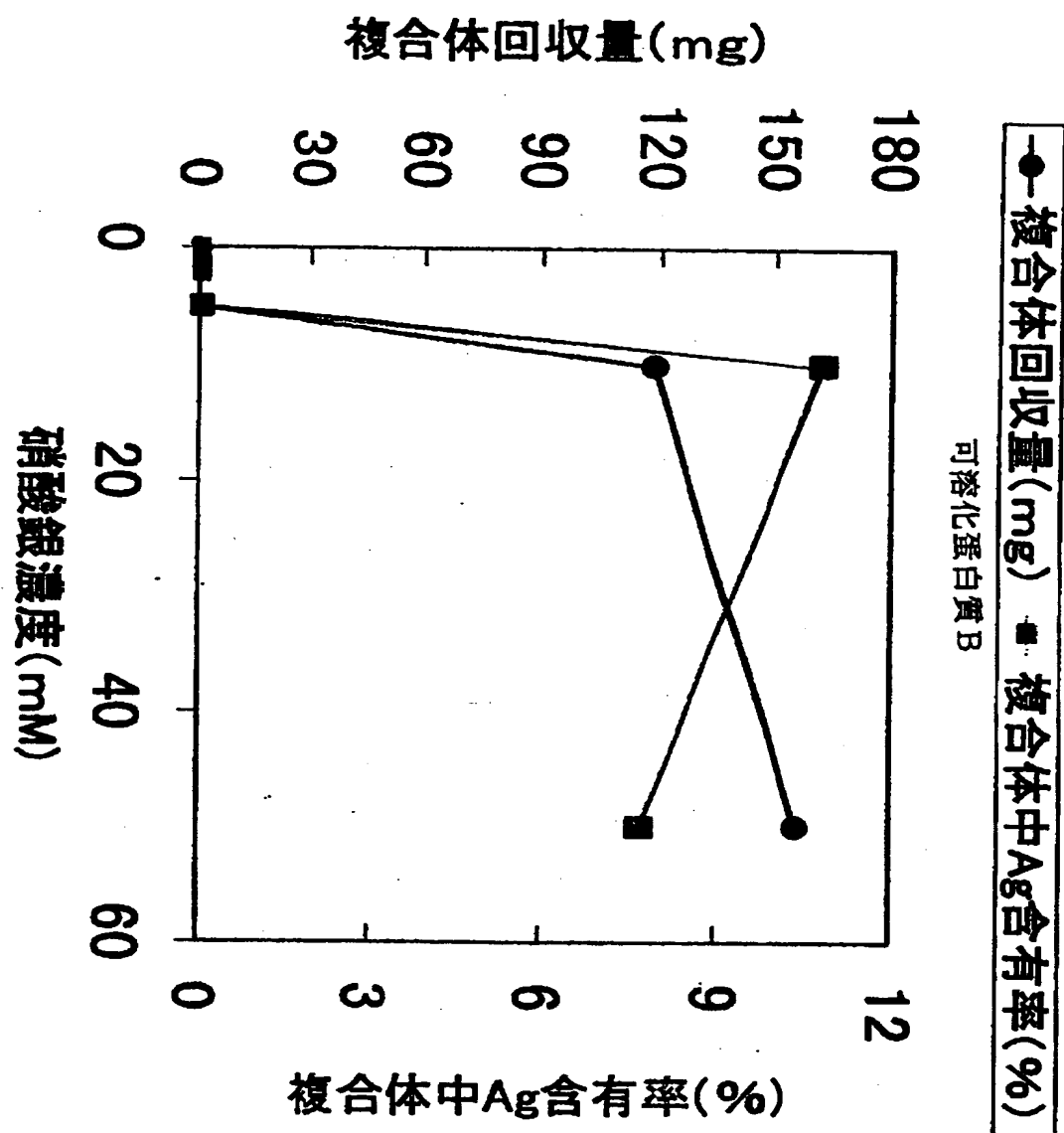
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【図3】

銀含有複合蛋白質②



未塗工

[1]



塗工量 1 g/m^2

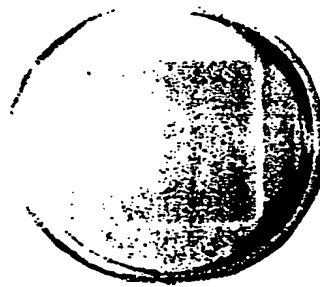
[3]

(a)



未塗工

[1]



塗工量 2 g/m^2

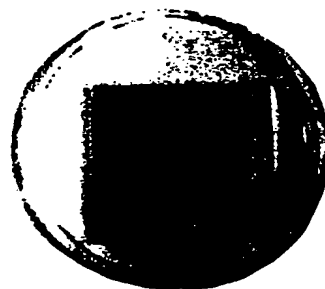
[3]

(b)



未塗工

[1]



塗工量 5 g/m^2

[3]

(c)

【図4】

銀含有複合蛋白質③



未塗工

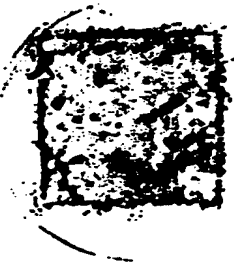
[1]



塗工量 1 g/m^2

[3]

(a)



未塗工

[1]



塗工量 2 g/m^2

[3]

(b)



未塗工

[1]



塗工量 4 g/m^2

[3]

(c)

【図 5】

Zeomic



未塗工

[1]



塗工量 1 g/m^2

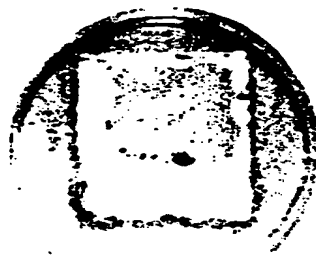
[2]

(a)



未塗工

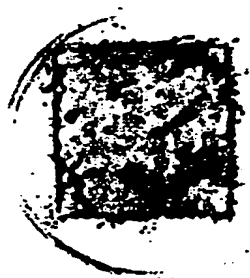
[1]



塗工量 2 g/m^2

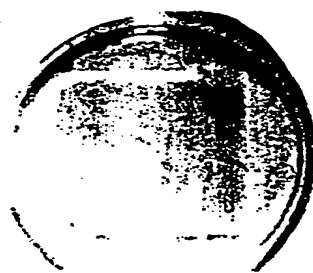
[2]

(b)



未塗工

[1]



塗工量 10 g/m^2

[3]

(c)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗菌性の銀が蛋白質から容易に遊離することがなく、銀含有率の高い水不溶性の複合蛋白質を提供することを課題とする。

【解決手段】 蛋白質中の活性チオール基の含有割合が0.1～200 μ モル/gである水可溶性の蛋白質と銀塩とを水中で接触させることにより得られる水不溶性の銀含有複合蛋白質により、上記の課題を解決する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000154727]

1. 変更年月日 1991年 3月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 大阪府大阪市東淀川区東淡路2丁目10番15号

氏 名 株式会社片山化学工業研究所

THIS PAGE BLANK (USPTO)